

· 药物代谢 ·

大黄酸肠溶缓释微丸在家兔体内的药代动力学研究

赵一洁, 张丹参, 张力*, 张夏微, 金灿
(河北北方学院药理学教研室, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:** 考察自制大黄酸肠溶缓释微丸在家兔体内的药动学过程, 将其与海藻酸钠溶液在兔体内大黄酸的药动学行为作比较, 以明确该缓释制剂在体内的药动学特征, 并对其相对生物利用度进行初步研究。**方法:** 采用双周期交叉设计, 按大黄酸量 10 只家兔单剂量口服 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。自制大黄酸肠溶缓释微丸和大黄酸的海藻酸钠溶液, 分别于服药前、服药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 24, 28, 32, 36 h 采血, 以高效液相色谱法测定大黄酸不同时间点的血浆浓度, 并进行统计学处理。**结果:** 两种制剂在家兔体内的药-时曲线中自制的大黄酸肠溶缓释微丸: t_{max} (9.73 ± 0.68) h, C_{max} (3.00 ± 0.81) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (59.21 ± 4.35) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, MRT (21.12 ± 1.12) h; 参比制剂: t_{max} (4.17 ± 0.12) h, C_{max} (2.71 ± 0.74) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (39.72 ± 3.11) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, MRT (9.33 ± 2.08) h 与参比制剂相比, 自制大黄酸肠溶缓释微丸的达峰时间更晚, 峰浓度更大, 两制剂间有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论:** 自制大黄酸肠溶缓释微丸生物利用度优于参比制剂。

[关键词] 大黄酸肠溶缓释微丸; 大黄酸; 药代动力学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0159-04

[doi] 10.11653/syfy2013080159

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130206.0859.003.html>

[网络出版时间] 2013-02-06 8:59

Studies on Pharmacokinetics of Rhubarb Acid Enteric-coated Sustained-release Pellets in Rabbits

ZHAO Yi-jie, ZHANG Dan-shen, ZHANG Li*, ZHANG Xia-wei, JIN Can
(College of Pharmacy, Hebei North University, Hebei Province, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the pharmacokinetics and bioequivalence of self-prepared rhubarb acid enteric-coated sustained-release pellets, and compare the pharmacokinetics of rhein between rhubarb acid enteric-coated sustained-release pellets and solution, make clear the pharmacokinetic character of the sustained release preparation *in vivo*. **Method:** Ten rabbits were given a single oral dose of $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of self-prepared rhubarb acid enteric-coated sustained-release pellets (test preparation) and the sodium alginate solution of rhein (reference preparation) in a crossover study. HPLC was applied to determine the plasma concentrations of rhein before and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 24, 28, 32, 36 h after administration of the medicine. The pharmacokinetic parameters were calculated and statistically analyzed. **Result:** The plasma concentration curves of both the sustained-release matrix pellets and the sodium alginate solution of rhein had one peak. The main pharmacokinetic parameters of test preparation were as follows: t_{max} (9.73 ± 0.68) h, C_{max} (3.00 ± 0.81) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (59.21 ± 4.35) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, MRT (21.12 ± 1.12) h; and those of reference preparation were as follows: t_{max} (4.17 ± 0.12) h, c_{max} (2.71 ± 0.74) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (39.72 ± 3.11) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, MRT (9.33 ± 2.08) h respectively. **Conclusion:** Compared with the sodium alginate solution of rhein, the self-

[收稿日期] 20121110(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274005);河北省教育厅资助项目(2010212)

[第一作者] 赵一洁, 硕士研究生, 从事神经药理学研究 Tel:15369337150, E-mail:zhaoyijieabc@163.com

[通讯作者] * 张力, 教授, 从事神经药理学研究 Tel:(0313)4029188, E-mail:zmczl@hotmail.com

prepared rhubarb acid enteric-coated sustained-release pellets have better bioavailability.

[Key words] rhubarb acid enteric-coated sustained-release pellets; rhein; pharmacokinetics

大黄酸是大黄、芦荟、虎杖等的主要有效成分之一,属单萜核类 1,8-二羟基蒽醌衍生物,具有电学氧化还原性质^[5],其在抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降糖调脂、保肝抗纤维化等多方面具有活性^[6],但由于其半衰期短,胃肠刺激大^[7-8]等因素,因此限制了其在临床中的应用发展。本实验利用海藻酸钠可与钙离子形成凝胶微丸的特点,制备大黄酸肠溶凝胶缓释微丸。其中自制微丸为受试试剂,大黄酸的海藻酸钠溶液为参比制剂,自制微丸所采用的是 2.5% 的含药海藻酸钠溶液(投药量:海藻酸钠 1:15)所制备的微丸,因此采用这种含药溶液作为所制备缓释微丸的参比制剂,由此对比自制微丸的缓释特性。体外释放度研究结果表明,微丸在模拟胃的酸性条件下并没有膨胀溶解释放药物,而是在肠溶液中开始缓慢释放药物。本文应用 HPLC 测定大黄酸在家兔体内的血药浓度并对其体内药动学进行研究。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Waters 600 高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司), WH861 旋涡混合器(北京科尔的科贸有限公司), 3K30 型超速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。大黄酸肠溶缓释微丸(河北北方学院药学院药剂学教研室自制), 大黄酸 ZL201201SDHS(质量分数 > 98%, 南京泽朗医药科技有限公司), 大黄酸对照品(110757, 中国药品生物制品检定所), 海藻酸钠(青岛明月海藻集团有限公司), 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物 新西兰白兔 10 只, 体质量 2~2.5 kg, 河北北方学院实验动物中心提供。动物合格证号医动字第 08-019 号。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Lanbo Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸(85:15)。检测波长 432 nm。流速 1 mL·min⁻¹ 流, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

2.2 给药方式及血浆样品处理 取白兔 10 只, 单剂量(35 mg·kg⁻¹) 自身交叉口服受试试剂和参比制剂, 实验前禁食 24 h, 自由饮水, 给药后 4 h 正常进食。经过 2 周的清洗期后再服用另一制剂。分别于服药前、服药后的 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 28, 32, 36 h 兔心脏取血 1 mL, 置于放有肝素的

离心管中, 置于 1.5 mL 肝素化试管(内含 1% 肝素 0.25 μL, 80 °C 烘干)。在 4 °C, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 0.2 mL, 加入 0.4 mL 甲醇, 用旋涡混合器震荡 1 min, 使蛋白变性, 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 脱蛋白, 再取上清液 0.3 mL, 加入 0.3 mL 甲醇 2 次脱蛋白, 以保证蛋白除净, 于 -80 °C 冰箱保存待测。用 HPLC 测定含量时需将样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 进样 20 μL。

2.3 方法专属性考察 在本实验采用的色谱条件下, 大黄酸的峰形良好, 无杂峰干扰, 保留时间为 6.853 min。可见本方法具有较高的专属性, 灵敏度高, 分离度好, 能够准确测定大黄酸的浓度。此处插入空白血浆、含对照品的空白血浆以及血浆样品的高效液相色谱图, 见图 1~4。

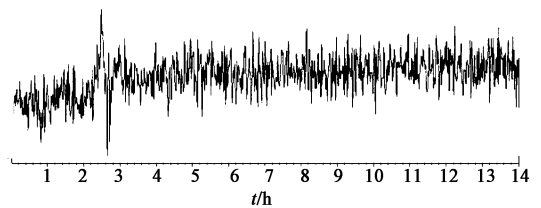


图 1 空白血浆的 HPLC

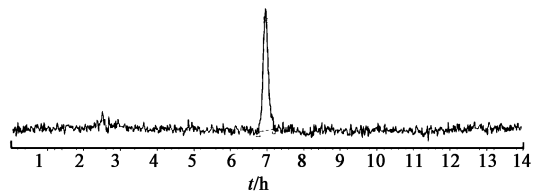


图 2 含大黄酸对照品的血浆 HPLC

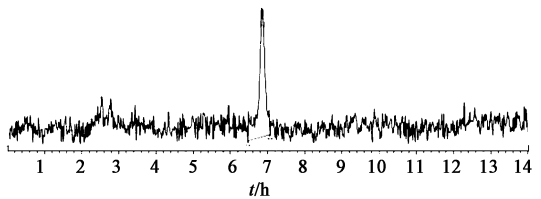


图 3 大黄酸缓释微丸样品的血浆 HPLC

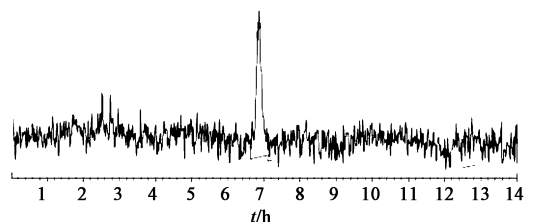


图 4 大黄酸参比制剂的血浆 HPLC

2.4 血浆标准曲线制备 精密称取大黄酸对照品 1 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇为溶剂定容到刻度,摇匀得 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大黄酸对照品溶液,备用。取新西兰白兔空白血浆,经过预处理后,加 Rhein 对照品溶液制成质量浓度分别为 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的一系列血浆样品,在上述 HPLC 条件下测定 Rhein 的峰面积。以 Rhein 质量浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制面积-浓度标准曲线,进行回归分析,求得线性回归方程 $Y = 7\,468.8X + 1\,528.8$, $r = 0.999\,4$,表明大黄酸在 $0.1 \sim 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好,最低检测质量浓度为 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 大黄酸在血浆中的回收率和精密度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 $/\%$	RSD $/\%$	日内精密度		日间精密度	
			质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$
0.1	92.7 \pm 3.90	4.52	0.090 \pm 0.007	4.87	0.091 \pm 0.011	4.96
2	90.9 \pm 4.37	4.69	1.971 \pm 0.003	4.15	1.971 \pm 0.007	4.15
10	93.8 \pm 3.12	3.81	9.835 \pm 0.016	4.97	9.836 \pm 0.016	4.71

2.6 稳定性考察 按 2.5 项下方法配制质量浓度分别为 0.1, 2, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大黄酸对照品溶液,每个浓度 3 个样本。将按 2.2 项下方法操作处理后的血样分别于室温和 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 72 h;未处理血样分别于室温, 4 $^{\circ}\text{C}$, -80 $^{\circ}\text{C}$ 存放 24 h、冻-融化循环 3 次和 -80 $^{\circ}\text{C}$ 存放 5 d,按 2.2 项下方法操作处理血样后测定,其含量变化均小于 5%,说明大黄酸在此条件下稳定。

2.7 数据处理 应用 3p87 软件计算药代动力学参数,并用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。所有实验数据的测定值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血药浓度 家兔单次口服大黄酸缓释微丸与参比制剂后平均血药浓度-时间曲线见图 5。

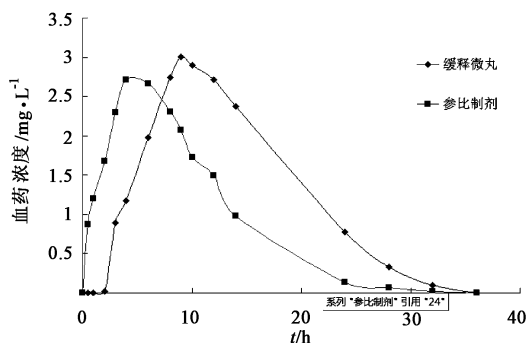


图 5 家兔单剂量口服大黄酸缓释微丸和参比制剂后的平均血药浓度-时间曲线 ($n = 10$)

3.2 药动学参数 微丸组和参比组制剂给药后不同时间点取血测得的血药浓度和时间数据用 3p87

2.5 方法回收率和精密度实验 分别于 1 mL 新西兰白兔空白血浆中加入高、中、低 3 个浓度的大黄酸标准溶液,使相应的血浆质量浓度为 0.1, 2, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度平行作 6 份,按“血浆样品预处理”项下操作,进样测定,以测得值与实际值之比计算其回收率。每个浓度样品在 1 日内重复测定 5 次,并在不同日期内分别测定 5 次,用同台仪器及当日标准曲线进行测定,计算日内和日间 RSD。结果见表 1,表明大黄酸的回收率在 90.9% ~ 93.8%,其日内和日间 RSD 均小于 5%,符合目前生物分析方法指导原则的要求。

软件对各个模型进行拟合,并根据 AIC 最小和理论血药浓度值与实验测定值的相关系数 r^2 最大的原则作为判断标准选择合适的模型,结果显示微丸组制剂和参比制剂组在家兔体内的过程均符合一室模型,权重为 1。所得的各药代动力学参数见表 2。其中 t_{\max} , C_{\max} 为实测数据,将各参数进行 t 检验。由表 2 结果可以看出,缓释微丸与参比制剂相比较,达峰时间 (t_{\max}) 与平均滞留时间 (MRT) 显著延长 ($P < 0.05$),峰浓度 (C_{\max}) 显著升高 ($P < 0.05$)。以参比制剂为对照,家兔给予大黄酸缓释微丸的相对生物利用度为 (149.07 \pm 6.12)%。

3.3 生物等效性评价 应用 3P87 软件评价生物等效性,对受试制剂和参比制剂的药动学参数 C_{\max} , AUC_{0-1} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 进行方差分析。结果显示,两剂型除制剂间变异的 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 有显著性差异 ($P < 0.05$) 外,周期间变异和个体间变异均 $P > 0.05$,说明本研究中周期间变异和个体间变异无显著性差异,制剂间变异有显著性差异。

4 讨论

检测大黄酸血药浓度的方法主要有 HPLC 法、UV 法及放射性标记法等,大黄酸的最大吸收峰有 257 nm 和 432 nm,但在血浆样品中,辅料中的海藻酸钠在 257 nm 处对大黄酸的干扰大,因此本实验选用 432 nm 作为检测峰。本实验中的辅料海藻酸钠^[9]在酸性溶液中不溶胀,遇到碱性环境下才开始缓慢溶胀,药物被缓慢释放出来,因此本实验所做的大黄酸缓释微丸在胃中几乎不释放药物,而是到达小

表 2 家兔口服大黄酸缓释微丸与参比制剂的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$t_{1/2}(k_a)/h$	$t_{1/2}(k_e)/h$	t_{lag}/h	t_{max}/h	$C_{max}/g \cdot L^{-1}$	k_a
大黄酸缓释微丸	2.53 ± 0.79	14.84 ± 2.31	2.94 ± 1.19	9.73 ± 0.68 ¹⁾	3.00 ± 0.81	0.27 ± 0.11
大黄酸参比	1.99 ± 0.63	4.36 ± 0.13	0.02 ± 0.71	4.17 ± 1.02	2.71 ± 0.74	0.35 ± 0.09

组别	k_e	$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$	$AUC_{0-t}/\mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$	MRT/h	F/%
大黄酸缓释微丸	0.05 ± 0.03	59.21 ± 4.35 ¹⁾	52.79 ± 3.91 ¹⁾	21.12 ± 1.12	149.07 ± 6.12
大黄酸参比	0.15 ± 0.59	39.72 ± 3.11	34.01 ± 0.77	9.33 ± 2.08	

注:与 大黄酸参比制剂比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

肠后开始缓慢释放药物,既减少药物对胃的刺激性,又有缓慢释放而达到长效利用的目的。海藻酸钙凝胶微丸是近年来发展起来的新型剂型,它作为口服药物的缓控释载体在国内外已受到广泛关注^[10]。

本实验中采用的参比制剂为含有适量大黄酸的 2.5% 的海藻酸钠溶液(海藻酸钠:大黄酸 15:1),采用此比例是为了更好的作为微丸的参照,虽然参比制剂只是含药的海藻酸钠溶液,但是与家兔口服单体大黄酸比较,参比制剂在口服后,达峰时间仍然滞后与单体,可能是由于海藻酸钠溶液在胃液中的不溶胀导致形成了一种致密的保护膜,而使药物比较难释放出来,具体原因有待进一步考察研究。

实验中,微丸给药方式采用口服给药,是将制备好的微丸放在空胶囊壳中给予兔子吞食,参比制剂采用灌胃给药。在预实验中,首先采用颈总动脉插管的方式进行取血,但是兔子在取血 10 次以后或者 12 h 以后容易死亡,无法达到 36 h 取血的要求,不可取。同时,预实验中也采用了耳缘静脉取血的方式进行取血,在取血 8 次以上就难以取出,取血间隔时间长才能取出,但是不按规定时间取血就无法更准确的反应血药浓度,不可取。因此实验中采用心脏取血,心脏取血技术很熟练,一般一针见血,而且兔子在做完一次药代实验后,悉心照顾,兔子依然状态良好,直至 2 周或 1 个月后进行第 2 次药代实验。

预实验中,给家兔口服大黄酸微丸后,有的家兔血药浓度-时间曲线呈现不规则的双峰现象,后经过仔细筛选,服用大小一致,粒径均匀的微丸,双峰现象有所消失,但不能完全避免。分析原因可能是微丸的形状不规则导致药物溶出不均匀所致。但经查文献得知,兔子如白天营养过剩,夜间会拉出一种软粪,这种软粪中的各种营养物质已呈半消化状态,容易被身体吸收和利用。兔子吃软粪后,合成的复合维生素 B 和 K 易被小肠吸收,以供机体生长的需要。因此,稍微不注意笼子,那些粪便有可能被兔子立刻吃掉,造成药物的第二次食用,这有可能是导致

出现双峰现象的原因。为了避免此种现象的产生,还需要进一步研究。

我国现在对中药单、复方制剂尚未作出进行药代动力学研究的规定,但进行其药代动力学研究是必然趋势,因此,结合现代科学技术,加大对中药研究的投入,着眼于开发是发展中医药的必由之路^[11]。

[参考文献]

[1] 张锦雯,王广基,孙建国,等. HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆中大黄酸的浓度及其药代动力学[J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 238.

[2] 谭力,袁倚盛,杨俊伟,等. 高效液相色谱法测定人血浆中大黄酸含量及药动学研究[J]. 金陵医院学报, 1998, 11(2): 112.

[3] 辛颖,耿慧春,刘照振,等. 三黄泻心汤及大黄中大黄酸在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 56.

[4] 谢兴亮,杨明,韩丽. pH 敏感双层型苦参结肠靶向微丸在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 128.

[5] 严志红,黎拒难,唐睿. 碳糊电极吸附催化伏安法测定大黄酸[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 329.

[6] 冯素香,谢新年,李建生,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度及在大鼠体内的药动学规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 140.

[7] 张锦雯,孙建国,王广基,等. 大黄酸在大鼠和比格犬体内的吸收动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 511.

[8] 邹世洁,崔巍,张宇鹏,等. 大黄酸对胃黏膜上皮细胞生长、增殖和凋亡的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(4): 447.

[9] 马萍,祝力,孙淑英,等. 海藻酸钙凝胶微丸作为口服缓释给药载体的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 406.

[10] 马萍,孙淑英. 一种新的缓释载体——海藻酸钙凝胶小球的研究概况[J]. 国外医药:合成药·生化药制剂分册, 1998, 19(3): 190.

[11] 唐洪梅,李锐. 中药及复方制剂现代化研究的重点——药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(5): 56.

[责任编辑 聂淑琴]